

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pendekatan dan Jenis Penelitian

3.1.1 Pendekatan Penelitian

Pada penelitian ini pendekatan yang digunakan adalah pendekatan kuantitatif yang bersandar pada pengumpulan dan analisis data numerikal (angka), melakukan eksperimen, mengadakan pengukuran dan observasi, serta melaksanakan pengujian teori dengan uji statistik.

3.1.2 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini yaitu eksperimen sesungguhnya (*True Experimental Research*). Disebut eksperimen sesungguhnya karena pemilihan kelompok subyek secara random, terdapat kelompok pembanding terhadap kelompok yang diberi perlakuan, dan adanya pengontrolan variabel luar yang mempengaruhi proses penelitian. Berdasarkan sifatnya, rancangan penelitian yang digunakan adalah desain faktorial (*Factorial design*).

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Muhammadiyah Malang di Jl. Raya Tlogomas No. 246 Malang. Waktu pelaksanaan penelitian pada tanggal 9 – 10 Agustus 2018.

3.3 Populasi, Teknik Sampling, dan Sampel

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans*.

3.3.2 Teknik Sampling

Teknik sampling menggunakan *Simple Random Sampling* yaitu pengambilan sampel secara acak sederhana. Teknik *Simple Random Sampling* digunakan karena dalam populasi terdapat sampel yang sama (homogen).

3.3.3 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang telah dibiakkan pada media *Mueller Hinton Agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Jenis Variabel

Penelitian ini terdiri dari tiga variabel yaitu, variabel bebas, variabel terikat, dan variabel kontrol. Adapun ketiga variabel tersebut adalah:

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah jenis pelarut dan konsentrasi. Penentuan konsentrasi dalam penelitian ini berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Alizadeh *et al.* (2015), menyatakan ekstrak selada air dengan pelarut methanol berpengaruh pada pertumbuhan bakteri pada konsentrasi hambat minimum 25% dan selada air dengan pelarut air

berpengaruh pada konsentrasi 50%. Sehingga dalam penelitian selanjutnya digunakan konsentrasi 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100%.

2. Variable Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

3. Variabel Kontrol

Variabel kontrol adalah variabel yang dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel yang lain (variabel bebas dan variabel terikat).

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah media biakan bakteri, suhu inkubasi, dan lama inkubasi.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Pelaksanaan penelitian agar mudah dan tidak menjadi terlalu luas maka dibuat definisi operasional variabel sebagai berikut:

1. Jenis pelarut adalah perbedaan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi daun selada air. Terdapat dua jenis pelarut yang digunakan yaitu pelarut etanol dan pelarut aquades. Sehingga akan dihasilkan dua jenis ekstrak yaitu ekstrak daun selada air dengan pelarut etanol dan ekstrak daun selada air dengan pelarut aquades yang masing-masing 25 mg.
2. Konsentrasi adalah angka banding volume zat terlarut (ekstrak daun selada air dengan jenis pelarut berbeda) terhadap volume zat pelarut (aquades). 25 mg ekstrak daun selada air dengan pelarut etanol dan 25 mg ekstrak daun selada air dengan pelarut aquades akan diencerkan menggunakan aquades dengan konsentrasi 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100% (Alizadeh *et al.*, 2015).

3. Zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* adalah diameter daerah yang tidak ditumbuhi bakteri *Streptococcus mutans* di sekitar paper disk dan diukur dengan jangka sorong dengan satuan milimeter.
4. Media biakan bakteri adalah tempat yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Streptococcus mutans*. Media yang digunakan yaitu media *Mueller Hinton Agar* dalam cawan petri dengan volume media 15 ml dan ketebalan media kurang dari 0,5 cm/ 5 mm.
5. Temperatur inkubasi adalah suhu yang digunakan dalam proses perawatan bakteri agar dapat berkembang dengan baik. Suhu optimum pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yaitu 37°C.
6. Masa inkubasi adalah waktu yang digunakan untuk mengetahui zona hambat *Streptococcus mutans* dari saat diberi perlakuan hingga pengamatan hasilnya berupa diameter zona hambat. Adapun waktu yang digunakan yaitu 24 jam.

3.5 Posedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

Tahap persiapan ini merupakan tahap dimana sebelum dilakukannya penelitian segala sesuatu yang dibutuhkan dalam penelitian harus disiapkan terlebih dahulu. Adapun hal-hal yang harus disiapkan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

a) Persiapan alat

- | | |
|----------------------|---------|
| 1. Tabung Reaksi | 10 buah |
| 2. Rak tabung reaksi | 2 buah |
| 3. Cawan petri | 30 buah |
| 4. Erlenmeyer | 1 buah |
| 5. Beaker glass | 1 buah |
| 6. Bunsen | 1 buah |

7. Inkubator	1 buah
8. Autoklaf	1 buah
9. Enkast	1 buah
10. <i>Hot plate magnetic styrer</i>	1 buah
11. Jangka sorong	1 buah
12. Timbangan analitik	1 buah
13. Blender	1 buah
14. Kertas cakram	1 tabung
15. Kertas label	1 lebar
16. Kertas saring <i>whatman</i>	2 buah
17. <i>Rotary evaporator</i>	1 buah
18. Jarum inokulasi	1 buah
19. Pinset	1 buah
20. Kertas bura	50 lebar

b) Persiapan Bahan

1. Daun selada air (<i>Nasturtium officinale</i> R. Br.)	5 kg
2. Biakan murni <i>Streptococcus mutans</i>	1 tabung reaksi
3. Medium <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)	13,68 gram
4. Aquades	625 ml
5. Etanol 70%	250 ml
6. BaCl 1%	0,05 ml
7. H ₂ SO ₄ 1%	9,95 ml

c) Pembuatan Medium Mueller Hinton Agar

- Timbang medium MHA sebanyak 13,68 gram
- Masukkan medium MHA ke dalam Erlenmeyer
- Tambahkan aquades sebanyak 360 ml
- Panaskan diatas *magnetic strier* hingga homogen
- Tutup bagian atas Erlenmeyer dengan kapas masukkan ke dalam otoklaf dan sterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atmosfer selama 15 – 20 menit (Waluyo, 2010).

d) Sterilisasi Alat dan Bahan

- Cuci tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, beaker glass, pinset hingga bersih dan dikeringkan.

- Bungkus tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, beaker glass, pinset dengan kertas buram.
- Masukkan alat yang sudah dibungkus dan media MHA ke dalam otoklaf dan sterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit dimulai dari thermometer pada otoklaf menunjukkan suhu 121°C.
- Tutup kran uap dan tunggu hingga suhu kembali ke 0°C baru otoklaf dibuka (Waluyo, 2010).

3.5.2 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor A adalah jenis pelarut dan faktor B adalah konsentrasi yang bisa dilihat pada Tabel 3.1 berikut ini.

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Antara Jenis Pelarut dan Konsentrasi

Faktor A, Faktor B	Faktor B				
	B ₀	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄
Faktor A					
A ₁	A ₁ B ₀	A ₁ B ₁	A ₁ B ₂	A ₁ B ₃	A ₁ B ₄
A ₂	A ₂ B ₀	A ₂ B ₁	A ₂ B ₂	A ₂ B ₃	A ₂ B ₄

Keterangan:

a. Faktor A : Jenis pelarut pada ekstrak daun selada air

A₁ = Ekstrak daun selada air dengan menggunakan pelarut etanol

A₂ = Ekstrak daun selada air dengan menggunakan pelarut aquades

b. Faktor B: Konsentrasi ekstrak (etanol atau aquades) daun selada air

B₀ = Konsentrasi 0% (kontrol)

B₁ = Konsentrasi 25%

B₂ = Konsentrasi 50%

B₃ = Konsentrasi 75%

B₄ = Konsentrasi 100%

Jumlah ulangan dianggap baik apabila telah memenuhi syarat sebagai berikut:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

$$(10-1)(r-1) \geq 15$$

t : Perlakuan

$$9(r-1) \geq 15$$

r : Ulangan

$$9r - 9 \geq 15$$

$$9r \geq 24$$

$$r \geq 2,67 \text{ dibulatkan menjadi } 3$$

Digunakannya rancangan acak lengkap (RAL) karena penelitian dilakukan di laboratorium maka diasumsikan setiap unit populasi adalah homogen dan memiliki karakteristik yang sama sehingga pengukuran awal tidak dilakukan. Sekelompok subyek dari penelitian ini diambil secara acak dari 8 kombinasi faktorial dan 2 kontrol dengan 3 kali ulangan. Adapun denah rancangan acak lengkap faktorial bisa dilihat pada Gambar 3.1 berikut ini:

(A ₁ B ₄) II	(A ₁ B ₀) II	(A ₁ B ₁) II
(A ₁ B ₄) III	(A ₂ B ₁) III	(A ₁ B ₃) I
(A ₁ B ₁) I	(A ₂ B ₄) III	(A ₂ B ₃) I
(A ₂ B ₂) I	(A ₁ B ₂) I	(A ₂ B ₄) II
(A ₂ B ₀) III	(A ₁ B ₀) I	(A ₂ B ₁) I
(A ₂ B ₂) III	(A ₁ B ₄) I	(A ₂ B ₀) II
(A ₁ B ₀) III	(A ₂ B ₁) II	(A ₁ B ₁) III
(A ₁ B ₂) III	(A ₂ B ₂) II	(A ₂ B ₄) I
(A ₂ B ₃) II	(A ₁ B ₃) III	(A ₁ B ₂) II
(A ₂ B ₀) I	(A ₁ B ₃) II	(A ₂ B ₃) III

Gambar 3.1 Denah Rancangan Acak Lengkap Faktorial

Keterangan:

A_1B_0 = ekstrak etanol daun selada air pada konsentrasi 0%

A_1B_1 = ekstrak etanol daun selada air pada konsentrasi 25%

A_1B_2 = ekstrak etanol daun selada air pada konsentrasi 50%

A_1B_3 = ekstrak etanol daun selada air pada konsentrasi 75%

A_1B_4 = ekstrak etanol daun selada air pada konsentrasi 100%

A_2B_0 = ekstrak aquades daun selada air pada konsentrasi 0%

A_2B_1 = ekstrak aquades daun selada air pada konsentrasi 25%

A_2B_2 = ekstrak aquades daun selada air pada konsentrasi 50%

A_2B_3 = ekstrak aquades daun selada air pada konsentrasi 75%

A_2B_4 = ekstrak aquades daun selada air pada konsentrasi 100%

I = Pengulangan ke 1

II = Pengulangan ke 2

III = Pengulangan ke 3

3.5.3 Pelaksanaan dan Alur Penelitian

a) Pembuatan Ekstrak Daun Selada Air

1. Siapkan tanaman selada air dan memisahkan daun dari tangkainya
2. Cuci daun selada air dengan air mengalir.
3. Timbang daun selada air sebanyak 5 kg dan dikeringkan dengan diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari hingga kering.
4. Haluskan daun selada air kering dengan blender hingga menjadi serbuk halus atau simplisia.
5. Masukkan simplisia daun selada air sebanyak 50g ke dalam 250 ml pelarut etanol 70% dan 50g ke dalam 250 ml aquades.

6. Homogenkan dengan *magnetic stirrer* hingga homogen
7. Tutup rapat dan diamkan selama 24 jam
8. Menyaring masing-masing ekstrak dengan kertas saring
9. Filtrat ekstraksi dengan pelarut etanol dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada temperatur 40°C
10. Hasil yang didapat berupa ekstrak etanol daun selada air konsentrasi 100% dan ekstrak aquades daun selada air konsentrasi 100%.
11. Simpan dalam botol steril

b) Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Daun Selada Air

Menurut Santoso (2008), untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat digunakan rumus sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = normalitas sebelum pengenceran

V_1 = volume sebelum pengenceran

N_2 = normalitas setelah pengenceran

V_2 = volume setelah pengenceran

Pengenceran dilakukan sesuai dengan perhitungan yang didapat. Adapun pengenceran yang dilakukan dapat dilihat pada Tabel 3.2 dibawah ini.

Tabel 3.2 Pengenceran Ekstrak Daun Selada Air Berbagai Konsentrasi

Konsentrasi Ekstrak Daun Selada air	Ekstrak Daun Selada Air (ml)	Aquades (ml)
Pelarut etanol	0% $\frac{0}{100} \times 10 = 0$	10
	25% $\frac{25}{100} \times 10 = 2,5$	7,5
	50% $\frac{50}{100} \times 10 = 5$	5
	75% $\frac{75}{100} \times 10 = 7,5$	2,5
	100% $\frac{100}{100} \times 10 = 10$	0
Pelarut aquades	0% $\frac{0}{100} \times 10 = 0$	10
	25% $\frac{25}{100} \times 10 = 2,5$	7,5
	50% $\frac{50}{100} \times 10 = 5$	5
	75% $\frac{75}{100} \times 10 = 7,5$	2,5
	100% $\frac{100}{100} \times 10 = 10$	0

c) Pemberian Konsentrasi Ekstrak pada Kertas Cakram

Kertas cakram sebanyak 30 buah dibagi sesuai dengan kelompok perlakuan. Terdapat 10 perlakuan kombinasi dengan 3 kali ulangan. Sehingga setiap 3 buah kertas cakram untuk 1 perlakuan. Pemberian ekstrak dilakukan dengan cara meletakkan kertas cakram pada cawan petri. Kemudian tambahkan ekstrak daun selada air hingga kertas cakram terendam dan diamkan selama 60 menit (Putri, Hafida, & Megawati, 2017).

d) Pembuatan Medium Biakan Bakteri MHA

1. Mengeluarkan medium MHA yang sudah setril dari otoklaf
2. Memanaskan kembali media MHA agar mencair
3. Menuangkan medium MHA cair sebanyak 15 ml ke dalam cawan petri di dalam enkast dan tunggu hingga padat (Waluyo, 2010).

e) Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus mutans*

Mengambil sebanya 1-2 ose dari biakan murni bakteri *Streptococcus mutans* dan diencerkan dengan NaCl 0.85% sampai didapatkan kekeruhan sesuai dengan standar Mc. Farland 0.5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Standar Mc. Farland 0.5 dibuat dari 0,05 ml BaCl 1% dan 9,95 ml H₂SO₄ 1% (Putri et al., 2017).

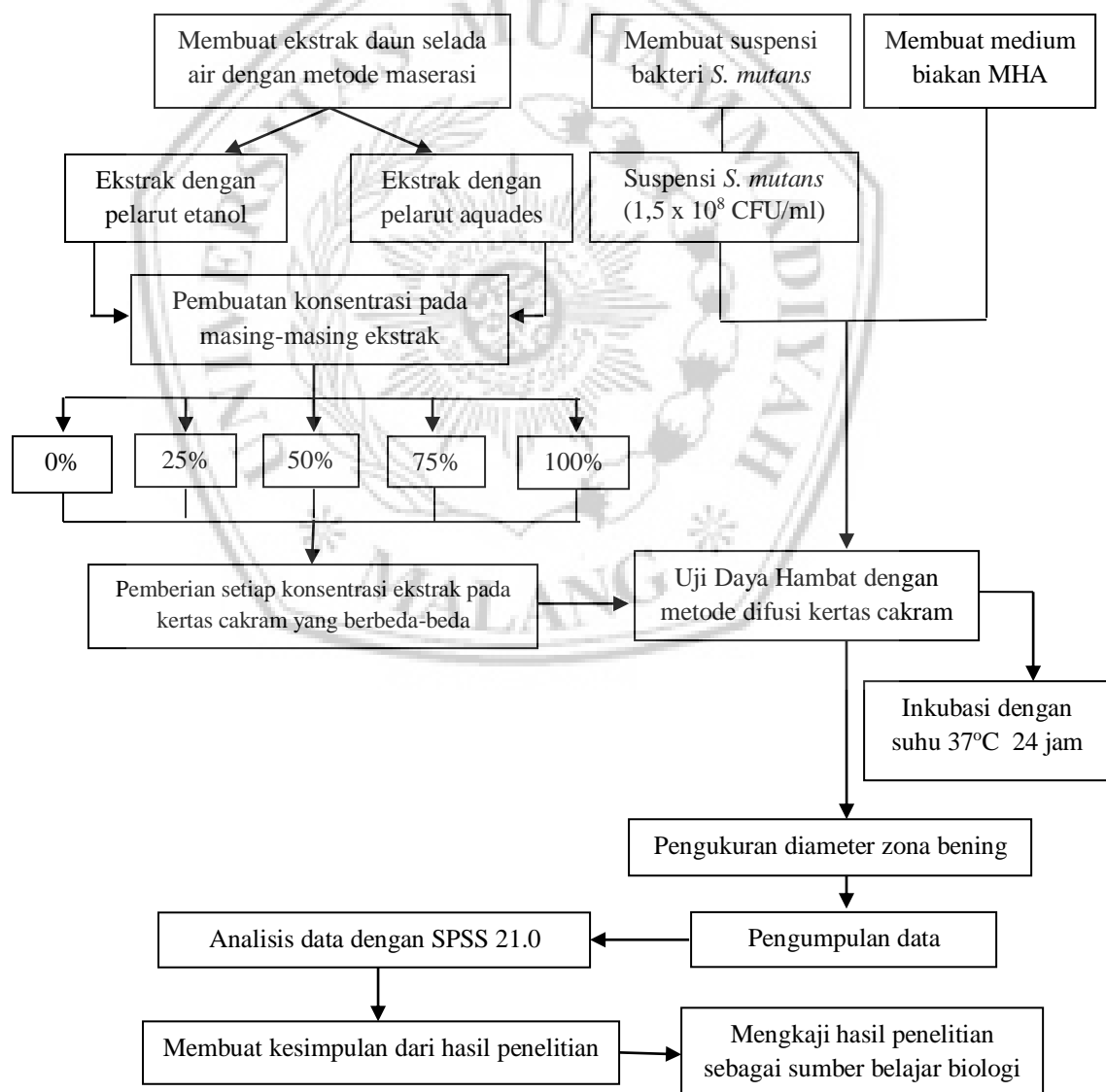
f) Uji Daya Hambat dengan Metode Difusi Kertas Cakram

1. Siapkan medium MHA
2. Celupkan kapas lidi steril ke dalam suspensi bakteri *Streptococcus mutans*
3. Peras dengan cara menekan kapas lidi pada dinding tabung reaksi
4. Goreskan kapas lidi di permukaan media MHA dengan teknik goresan sinambung. Goresan sinambung dilakukan dengan cara menggoreskan jarum ose secara kontinyu sampai setengah permukaan medium MHA dengan tanpa memijarkan jarum ose, cawan petri diputar 180°C dilanjutkan goresan sampai habis (Waluyo, 2010).
5. Masukkan kertas cakram yang telah diberi ekstrak selada air ke dalam cawan petri. Kertas cakram tersebut diletakkan pada permukaan media yang terdapat biakan bakteri *Streptococcus mutans*, tekan dengan pinset agar kertas cakram benar-benar menempel pada media.
6. Beri label pada bagian luar cawan petri sesuai dengan perlakuan.
7. Letakkan kedalam inkubator dengan susunan sesuai dengan RAL
8. Menginkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

g) Pengamatan Diameter Zona Hambat

1. Keluarkan semua cawan dari inkubator
2. Letakkan cawan petri secara berderet diatas meja sesuai dengan urutan
3. Mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan jangka sorong.
4. Mencatat data dalam tabel

h) Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

3.6 Metode Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasi eksperimen secara langsung dengan prosedur berencana yang melibatkan kegiatan melihat dan mencatat aktivitas tertentu. Observasi dilakukan di laboratorium terhadap obyek perlakuan. Observasi eksperimen dalam penelitian ini adalah mengukur diameter zona hambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* dengan jangka sorong dengan satuan mm. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dicatat pada Tabel 3.3 dibawah ini.

Tabel 3.3 Data Rata-rata Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus mutans*.

Kombinasi Perlakuan	Ulangan Ke			Total Diameter Zona Hambat (mm)	Rata-rata (mm)
	I	II	III		
A ₁ B ₀					
A ₁ B ₁					
A ₁ B ₂					
A ₁ B ₃					
A ₁ B ₄					
A ₂ B ₀					
A ₂ B ₁					
A ₂ B ₂					
A ₂ B ₃					
A ₂ B ₄					

3.7 Teknik Analisis Data

Teknik analisis data yang digunakan adalah analisis deskriptif kuantitatif yaitu berupa angka. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan program SPSS 22.0. Data yang didapat akan diolah dengan dilakukannya uji normalitas dan uji homogenitas untuk mengetahui data berdistribusi normal dan varian datanya homogen. Jika didapat data berdistribusi normal dan varian datanya homogen maka dilanjutkan dengan analisis varian dua arah (*Two Way Anava*) untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut dan konsentrasi ekstrak selada air. Kemudian dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk membandingkan hasil yang diperoleh dari setiap perlakuan.

